

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
14. November 2002 (14.11.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 02/090983 A2

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: G01N 33/53

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/AT02/00112

(22) Internationales Anmeldedatum:
26. April 2002 (26.04.2002)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
GM 370/2001 10. Mai 2001 (10.05.2001) AT

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von
US): MEDSYSTEMS DIAGNOSTICS GMBH [AT/AT];
Rennweg 95 b, A-1030 Wien (AT).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): RECH-WEICHSEL-
BRAUN, Irene [AT/AT]; Hofackergasse 5, A-2161 Laxen-
burg, AT (AT). SCHAUDE, Michael [AT/AT]; Korb-
gasse 2-4/12, A-1230 Wien, AT (AT).

(74) Anwalt: HAFFNER, Thomas, M.; Schottengasse 3a,
A-1014 Wien (AT).

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,
CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE,
GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR,
KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK,
MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU,
SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG,
US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK,
ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR),
OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu
veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe
der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: QUANTITATIVE SINGLE-STEP IMMUNOASSAY IN LYOPHILISED FORM

(54) Bezeichnung: QUANTITATIVER EINSCHRITT IMMUNTEST IN LYOPHILISierter FORM

(57) Abstract: An immunoassay kit for the qualitative and quantitative determination of a sample by means of specific binding partners, such as, for example, antibodies, antigens, receptors and ligands comprises a support or microtitre plate with a number of recesses. Said support or microtitre plate is pre-coated with a primary binding partner and the binding partner is applied and fixed as a lyophilisate. In addition a reference standard series of the sample to be determined lies in a part of the recesses of the microtitre plate with incremental dilution in lyophilised form.

(57) Zusammenfassung: Ein Immun-Test-Kit für die qualitative und quantitative Bestimmung einer Probe durch spezifische Bindungspartner wie z.B. Antikörper, Antigene, Rezeptoren und Liganden besteht aus einer Träger- bzw. einer Mikrotiterplatte mit einer Mehrzahl von Vertiefungen, wobei der Träger bzw. die Mikrotiterplatte mit einem primären Bindungspartner vorbeschichtet ist und der Bindungspartner fixiert als Lyophilisat vorliegt. In einem Teil der Vertiefungen der Mikrotiterplatte liegt zusätzlich eine Referenzstandardreihe der zu bestimmenden Probe mit inkrementeller Verdünnung in lyophilisierter Form vor.

BEST AVAILABLE COPY

Quantitativer Einschnitt Immuntest in lyophilisierter Form

Die Erfindung bezieht sich auf einen Immun-Test-Kit für die qualitative und quantitative Bestimmung einer Probe durch spezifische Bindungspartner wie ~~z.B. Antikörper, Antigene,~~ Rezeptoren und Liganden, mit einer Träger- bzw. einer Mikrotiterplatte mit einer Mehrzahl von Vertiefungen, wobei der Träger bzw. die Mikrotiterplatte mit einem primären Bindungspartner vorbeschichtet ist und der Bindungspartner fixiert als Lyophilisat vorliegt.

Immuntests, Enzym gekoppelte Immuntests, Fluoreszenz Label gekoppelte Immuntests, Lumineszenz Label gekoppelte Immuntests oder mit einem anderen Label markierte Immuntests werden in der Routinediagnostik und Forschungsdiagnostik zur Detektion und Quantifizierung von Proteinen, zum Beispiel Antigenen, Liganden, Rezeptoren, Antikörpern sowie von chemischen Verbindungen eingesetzt. Stand der Technik ist es, in solchen Test-Kits einen der Bindungspartner an einen festen Träger, zum Beispiel eine Polystyrolplatte, zu binden und die weiteren für die Versuchsdurchführung benötigten Reagentien als separate Komponenten des Testkits hinzuzufügen. Diese Reagentien sind üblicherweise das nachzuweisende Protein in quantifizierter Form als Konzentrat oder Lyophilisat (Referenzstandard), ein Standard- und Probenverdünnungsmedium, der zweite spezifische Bindungspartner in gekoppelter Form (Konjugat) als Konzentrat oder Arbeitslösung, falls benötigt ein sekundäres Detektionssystem sowie im Falle eines Enzymlabels das zum Nachweis benötigte Substrat-Reagenz. Zur Terminierung der enzymatischen Reaktion wird eine Stopp-lösung beigelegt, zum Herstellen der Arbeitslösungen für den zweiten spezifischen Bindungspartner sowie für das Sekundärreagenz steht ein Assaypuffer zur Verfügung, welcher meist als Konzentrat vorliegt. Da zwischen den Arbeitsschritten Waschschritte erforderlich sind, enthält ein herkömmlicher Immun-Test-Kit einen Waschpuffer, üblicherweise in konzentrierter Form.

Kommerzielle ELISA Kits bieten dem Anwender validierte Testsysteme. Die Produkte enthalten alle für die Testdurchführung erforderlichen Reagentien in optimierten Konzentrationen und Mengen sowie ein detailliertes Protokoll zur Durchführung des Tests. ~~Die einzelnen Reaktionsschritte werden üblicherweise~~ konsequente durchgeführt. Die gemeinsame Inkubation von Analyten (Standard, Probe) und sekundärem Antikörper mit der Festphase (Cocktail) ist für eine Vielzahl von Testsystemen möglich.

Ein typisches Beispiel für einen Immuntest ist der Sandwich ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay).

Typischer Weise enthalten solche ELISA Kits folgende Komponenten:

- Mikrotiterplatte mit 96 Vertiefungen, vorbeschichtet mit dem primären Antikörper, geblockt, fixiert.
- Referenzmaterial: Analyt (Standard) in definierter Konzentration zur Erstellung einer Standardreihe
- Enzym- (Horse Radish Peroxidase) oder Biotin-gekoppelter Sekundärantikörper
- Falls erforderlich Streptavidin-Enzym (Horse Radish Peroxidase)
- Substratlösung (Tetramethylen-Benzidin)
- Waschpuffer: Salzlösung zum Waschen der Platten vor der Probeninkubation und zwischen den Reaktionsschritten
- Assay-Puffer: Salzlösung zur Verdünnung des Sekundärantikörpers und Streptavidin-Enzym Konzentrates (Herstellen der Arbeitslösungen)
- Probenverdünnungsmedium: Spezifisches flüssiges Medium zur Verdünnung des Referenzmaterials sowie der unbekannten Proben
- Stopp-Lösung zur Beendigung der enzymatischen Reaktion

Zur Testdurchführung sind durch den Anwender folgende Arbeitsschritte durchzuführen:

- 3 -

- Herstellung der Arbeitslösungen
- Erstellung der Standardreihe durch Verdünnung des Referenzmaterials
- Waschen der Mikrotiterplatte
- ~~Vorlegen des Probenverdünnungsmediums.~~
- Auftragen der einzelnen Referenzverdünnungen (Standardreihe)
- Auftragen der unbekannten Proben
- Zugabe des Enzym- oder Biotin-gekoppelten Sekundärantikörpers
- Waschen der Mikrotiterplatte
- Optional Zugabe von Streptavidin-Enzym
- Waschen der Mikrotiterplatte
- Zugabe des Substrates
- Zugabe der Stopplösung
- Messung der optischen Dichte

Die Erfindung zielt nun darauf ab, die Handhabung derartiger Test-Kits zu vereinfachen und neben einer qualitativen Aussage auch quantitative Aussagen zu ermöglichen. Des weiteren zielt die Erfindung neben der Reduktion des Arbeitsaufwandes und der zur Testdurchführung benötigten Zeit darauf ab, die Fehlerwahrscheinlichkeit für den Anwender durch Minimierung der durchzuführenden Arbeitsschritte zu reduzieren. Schließlich ist es Ziel der vorliegenden Erfindung, die Verpackungsvolumina sowie Verpackungskosten ebenso wie die Versandkosten durch deutliche Gewichtsverringering und Volumsverringering der Kits herabzusetzen und eine logistische Vereinfachung bereitzustellen, bei welcher standardisierte Basis-Kits mit verbesserter Lagerfähigkeit des Produktes zur Verfügung gestellt werden.

Zur Lösung dieser Aufgabe besteht der erfindungsgemäße Immun-Test-Kit im wesentlichen darin, daß in einem Teil der Vertiefungen der Mikrotiterplatte zusätzlich eine Referenzstandardreihe der zu bestimmenden Probe mit inkrementeller Verdünnung in lyophilisierter Form vorliegt. Dadurch, daß der Träger bzw. die Mikrotiterplatte zusätzlich bereits eine Referenz-

renzstandardreihe der zu bestimmenden Probe enthält, wird die Möglichkeit geschaffen, neben einer rein qualitativen Analyse auch eine quantitative Abschätzung und eine quantitative Bestimmung durch Interpolation zwischen definierten Testergebnissen im ~~Bereich zwischen inkrementell benachbarten Standards~~ vorzunehmen, wobei der aufwendige Schritt der Herstellung der Arbeitslösung des Referenzmaterials und der Herstellung der entsprechenden Verdünnungsreihe bei der Laborbestimmung entfällt. Mit einer derartigen Ausbildung des Immun-Test-Kits, bei welcher das Herstellen der Arbeitslösung des Referenzmaterials und das Auftragen des Standardverdünnungsmediums in die für die Standardreihe vorgesehenen Vertiefungen der Mikrotiterplatte entfällt, läßt sich somit bereits eine wesentliche Rationalisierung und Vereinfachung des Verfahrens und insbesondere eine exakt reproduzierbare Standardreihe vorgeben, wodurch die Fehlerwahrscheinlichkeit bereits wesentlich verringert wird.

In besonders vorteilhafter Weise kann aber die Vorfertigung des Immun-Test-Kits noch wesentlich weiter vorangetrieben werden und die notwendigen Bestimmungsschritte für die Probe weiter reduziert werden. Zu diesem Zweck ist mit Vorteil die Ausbildung so getroffen, daß die Vertiefungen der Mikrotiterplatte zusätzlich ein Enzym- oder Biotin-gekoppeltes Konjugat eines Sekundärbindungspartners, insbesondere -antikörpers, und im Fall des Biotin-gekoppelten Konjugates ein Enzym in lyophilisierter Form enthalten. Auf diese Weise wird neben der Standardreihe zur Quantifizierung des nachzuweisenden Proteins in definierten Proteinkonzentrationen auch der zweite, spezifische mit einem der oben genannten Labels gekoppelte Bindungspartner (Konjugat in titrierter Konzentration sowie gegebenenfalls das sekundäre Reagenz) zum Nachweis gemeinsam mit dem fest an Phasen gebundenen primären Bindungspartner bereits in lyophilisierter Form in der Festphase eingebracht, wobei die Bereitstellung dieser Komponenten in lyophilisierter Form, d. h. somit in bei tiefen Temperaturen von etwa -30°C dehydrierter Form, die Reaktionskinetik soweit einfriert, daß keine Vorabreaktion des Referenzmaterials zu befürchten ist. Da hochverdünnte Arbeitslösungen

ebenso wie begrenzt stabile Lösungen nicht vorrätig gehalten werden, sondern vielmehr erst unmittelbar zu Testbeginn durch Zugabe von Lösungsmittel bzw. Rehydrierung auf dem Träger erzeugt werden, werden weitere mögliche Fehlerquellen ausgeschlossen.

In weiterer Verbesserung und zur weiteren Verringerung der erforderlichen Arbeitsschritte bei der Bestimmung ist die Ausbildung so getroffen, daß die Vertiefungen der Mikrotiterplatte ein Probenverdünnungsmedium in lyophilisierter Form enthalten. Das spezifische Probenverdünnungsmedium kann hierbei bei einer Temperatur von beispielsweise 2°C in der benötigten Menge in die entsprechenden Vertiefungen der Mikrotiterplatte eingebracht werden, wobei das Sekundärantikörper-Enzymkonjugat bzw. das Gemisch aus Sekundärantikörper-Biotinkonjugat bei gleicher Temperatur in alle Vertiefungen der Mikrotiterplatte eingebracht werden kann, worauf die so beschickte Mikrotiterplatte einem Gefriertrocknungsprozeß in einer beispielsweise auf -30°C vorgekühlten Gefriertrocknungsanlage der Lyophilisierung unterzogen wird.

Ein derartiger vorkonfektionierter Träger bzw. eine derartige vorkonfektionierte Mikrotiterplatte erfordert zur Vervollständigung des Test-Kits nur mehr eine geringe Anzahl zusätzlicher Komponenten, wobei mit Vorteil der Test-Kit zusätzlich zur vorbeschichteten Mikrotiterplatte lediglich Waschpuffer, Substratlösung und Stopplösung enthält. Für die Bestimmung der Probe ist es somit lediglich erforderlich, die Mikrotiterplatte durch Zugabe definierter Volumina an destilliertem Wasser zu den Vertiefungen der Standardreihe, gegebenenfalls den Blanks und den Probenvertiefungen, zu rehydrieren, worauf die unbekannte Probe aufgegeben und inkubiert wird. Nach einem Waschen der Mikrotiterplatte und dem Auftragen des Substrates in alle für den Test verwendeten Vertiefungen der Mikrotiterplatte wird nach vorbestimmter Zeit die Stopplösung zugegeben und es kann unmittelbar die Testauswertung vorgenommen werden.

Mit Vorteil ist die Ausbildung hiebei so getroffen, daß im Falle von Biotin-gekoppeltem Sekundärantikörper-Konjugat als Sekundärreagenz Streptavidin - Horse Radish Peroxidase (HRP) eingesetzt ist.

Insgesamt wird durch die erfindungsgemäße Ausbildung die Testdurchführung für den Anwender auf die Zugabe der unbekannten Probe sowie die enzymatische Reaktion reduziert, wobei alle weiteren Schritte zuvor vom Hersteller des ELISA Kits durchgeführt werden. Die Mikrotiterplatte wird somit beim Hersteller mit dem spezifischen Primärantikörper beschichtet, geblockt und fixiert, worauf die Platte beispielsweise auf -20°C gekühlt wird und die oben beschriebenen zusätzlichen Schritte zum Einbringen der Standardreihe des Probenverdünnungsmittels sowie des Sekundärantikörper-Enzymkonjugates bzw. des Gemisches aus Sekundärantikörper-Biotinkonjugates und Streptavidin-Enzymes in definierter Weise beim Hersteller vorgenommen werden. Die Testdurchführung reduziert sich somit auf die Zugabe der zu analysierenden Proben sowie die Testauswertung aufgrund der Substratfärbung.

In besonders vorteilhafter Weise ist der Immun-Test-Kit nach der vorliegenden Erfindung so ausgestaltet, dass der Test-Kit Stabilisatoren für Peroxidase beziehungsweise generelle Lyoprotektanten wie Proteine (z.B. Albumin (z.B. BSA) Protein Hydrolysate (Peptone, Gelatine...) Casein), Polymeren (z.B. Dextran, PVA, PVP), Zucker (z.B. Saccharose, Trehalose, Lactose, Xylit, Sorbit, Mannit, Maltose, Glucose, Inosit), Bakteriostatische Mittel (z.B. Thimerosal, Proclin), phenolische Substanzen und Aniline auch mit Substituenten (kleine Alkyl-Reste oder Cl, Br...) (z. B. o-Methoxyphenol, o-Methylphenol, p-Methylphenol, o-Aminophenol, o-Hydroxybenzoesäure, (o, m oder p)-Hydroxybenzylalkohol, Anilin, p-Aminobenzoessäure, p-Methoxyanilin, Benzylalkohol, Benzoessäure, p-Nitrophenol, Benzylamin, 1-Phenyl-1,2-ethandiol, trans-1,2-Cyclohexandiol, cis-1,2-Cyclohexandicarbonsäure, Cyclohexylamin); Hydrophobe Verbindungen und

- 7 -

Verbindungen und Lösungsmitteln (z.B. DMF, Ethylenglykol, DMSO); Detergenzien (z.B. Tween-20); Aryl-Borsäureverbindungen (z.B. Phenylborsäure, 4-Brom-Phenylborsäure, 3-Acetamidophenyl-borsäure, 1-Naphtyl-borsäure); Substratanalogen (z.B. TMB, Luminol); Poly-Hydroxy-Verbindungen (z.B. Polyole, Polyethylenglykol, Glycerin); Ectoine (z.B. (S)-2-methyl-1,4,5,6-tetrahydropyrimidine-4-carboxylic acid [THP(B)], (S,S)- β -2-methyl-5-hydroxy-1,2,4,5,6-tetrahydropyrimidine-4-carboxylic acid, [THP(A)]); Ionen bzw. polyvalente Ionen (z. B. Metalionen (Al, Zn, Mg, Fe, Cu,...)); Komplexbildnern (z.B. EDTA); Aminosäuren (z.B. Glyzin, Prolin, 4-Hydroxyprolin, Serin, Glutamat, Alanin, Lysin, Sarcosin, γ -Aminobutyric acid, Phenylalanin) und/oder Substanzen wie TRIS, Salze, Amine, Na-Cholate, Saccharose monolaurat, 2-O- β -Mannosylglyzerat enthält.

Mit Rücksicht auf die besonders einfache Verfahrensweise eignet sich der vorliegende Immunttest-Kit für eine Vielzahl von möglichen Anwendungen. In besonders vorteilhafter Weise erfolgt die Verwendung eines derartigen Immunttest-Kits für den Einsatz in der Forschungsdiagnostik und in-vitro Diagnostik, für den Einsatz in der Erregerserologie, wie zum Beispiel zum Nachweis von Infektionen durch HIV, HepV, EBV, CMV usw., für den Einsatz in der Tumordiagnostik, wie zum Beispiel zum Nachweis von Tumormarkern oder Tumor assoziierten Proteinen, Vaskularisierungsmarkern, Metastasierungsmarkern usw., für den Einsatz in der Allergologie wie zum Beispiel zum Nachweis von Tierallergenen, Pflanzenpollen, Nahrungsbestandteilen usw., für den Einsatz in der Autoimmun-Diagnostik wie zum Beispiel zum Nachweis der Auto-Antigene im Bereich ANA/ENA, Diabetes mellitus/ IDDM, Schilddrüsen Antigene, Autoimmun Hepatitis, APS, usw., für den Nachweis von immunologischen Störungen durch entzündliche Prozesse oder Infektionen wie zum Beispiel zum Nachweis von Zytokinen, Adhäsionsmolekülen, Chemokinen, usw., für den Nachweis von Änderungen des Hormonhaushaltes wie zum Beispiel Ovulationstests, Schwangerschaftstests, usw., für den Einsatz zum Therapie-Monitoring wie zum Beispiel zum Nachweis von therapeutischen Antikörpern und Antigenen, organischen und

anorganischen Verbindungen, für den Nachweis von Zelltod durch Apoptose oder Nekrose und/oder für den Nachweis von genetischen Veränderungen, genetischen Erkrankungen.

Die Erfindung wird nachfolgend anhand einer Gegenüberstellung zum Stand der Technik näher erläutert, wobei der Stand der Technik als Standard-Kit bezeichnet wird.

1. Komponenten der ELISA Kits:

a) direkt Enzym gekoppeltes Konjugat

	Standard Kit		Einschritt Kit der vorliegenden Erfindung
1	Antikörper-beschichtete Mikrotiterplatte	1	Antikörper beschichtete Mikrotiterplatte inklusive Standardreihe, Probenverdünnungsmedium, Konjugatantikörper
2	Standardmaterial		
3	Assay-Puffer		
4	Konjugatantikörper		
5	Probenverdünnungsmedium		
6	Waschpuffer	2	Waschpuffer
7	Substratlösung	3	Substratlösung
8	Stopplösung	4	Stopplösung

- 3 -

b) zweiter Antikörper an Biotin gekoppelt, Sekundärreagenz Streptavidin-Horse Radish Peroxidase (HRP) o.ä.

	Standard Kit		Einschritt Kit der vorliegenden Erfindung
1	Antikörper- beschichtete Mikrotiterplatte	1	Antikörper-beschichtete Mikrotiterplatte inklusive Standardreihe, Probenverdünnungsmedium, biotinylierter Antikörper, Streptavidin-HRP o.ä.
2	Standardmaterial		
3	Assay-Puffer		
4	Biotinylierter Antikörper		
5	Streptavidin-HRP o.ä.		
6	Probenverdünnungsmedium		
7	Waschpuffer	2	Waschpuffer
8	Substratlösung	3	Substratlösung
9	Stopplösung	4	Stopplösung

2. Arbeitsschritte zur Testdurchführung:

a) direkt Enzym gekoppeltes Konjugat

	Standard Kit		Einschritt Kit der vorliegenden Erfindung
1	Waschen der Antikörper- beschichteten Mikrotiterplatte		
2	Herstellen der Arbeitslösung des Referenzmaterials (Standard)		
3	Auftragen des Standardverdünnungsmediu ms in die für die Standardreihe vorgesehenen Vertiefungen der Mikrotiterplatte		
4	Externe oder interne (in der Platte) Verdünnung der Arbeitslösung des Standards in definierte Konzentrationen (Standardreihe)		

4a	Gegebenenfalls Einbringen der Standardverdünnungen in die entsprechenden Vertiefungen der Mikrotiterplatte		
5	Auftragen des Probenverdünnungsmedium als Nullwert (blank) in die entsprechenden Vertiefungen der Mikrotiterplatte		
6	Einbringen des benötigten Volumens des Probenverdünnungsmediums in die entsprechenden Vertiefungen der Mikrotiterplatte	1	Rehydrierung der Mikrotiterplatte (Zugabe definierter Volumina an destilliertem Wasser zu den Vertiefungen der Standardreihe, Blank und den Probenvertiefungen)
7	Auftragen der unbekannten Proben	2	Auftragen der unbekannten Proben
8	Herstellen der Arbeitslösung des HRP-Konjugates o.ä.		
9	Auftragen des HRP-Konjugates (o.ä.) in alle für den Test verwendeten Vertiefungen der Mikrotiterplatte		
10	Inkubation	3	Inkubation
11	Waschen der Mikrotiterplatte	4	Waschen der Mikrotiterplatte
12	Auftragen des Substrates in alle für den Test verwendeten Vertiefungen der Mikrotiterplatte		Auftragen des Substrates in alle für den Test verwendeten Vertiefungen der Mikrotiterplatte
13	Zugabe der Stopplösung	5	Zugabe der Stopplösung
14	Testauswertung	6	Testauswertung

b) zweiter Antikörper an Biotin gekoppelt, Sekundärreagenz Streptavidin-Horse Radish Peroxidase (HRP) o.ä.

	Standard Kit		Einschritt Kit der vorliegenden Erfindung
1	Waschen der Antikörper beschichteten Mikrotiterplatte		
2	Herstellen der Arbeitslösung des Referenzmaterials (Standard)		

3	Auftragen des Standardverdunnungsmediums in die für die Standardreihe vorgesehenen Vertiefungen der Mikrotiterplatte		
4	Externe oder interne (in der Platte) Verdünnung der Arbeitslösung des Standards in definierte Konzentrationen (Standardreihe)		
4a	Gegebenenfalls Einbringen der Standardverdünnungen in die entsprechenden Vertiefungen der Mikrotiterplatte		
5	Auftragen des Probenverdunnungsmedium als Nullwert (blank) in die entsprechenden Vertiefungen der Mikrotiterplatte		
6	Einbringen des benötigten Volumens des Probenverdunnungsmediums in die entsprechenden Vertiefungen der Mikrotiterplatte	1	Rehydrierung der Mikrotiterplatte (Zugabe definierter Volumina an destilliertem Wasser zu den Vertiefungen der Standardreihe, Blank und den Probenvertiefungen)
7	Auftragen der unbekannten Proben	2	Auftragen der unbekannten Proben
8	Herstellen der Arbeitslösung des biotinylierten Antikörpers		
9	Auftragen des Biotin-Konjugates in alle für den Test verwendeten Vertiefungen der Mikrotiterplatte		
10	Inkubation		
11	Waschen der Mikrotiterplatte		
12	Herstellen der Streptavidin-HRP o.ä. Arbeitslösung		
13	Auftragen der Streptavidin-HRP o.ä. Lösung in alle für den Test verwendeten Vertiefungen der Mikrotiterplatte		

14	Inkubation	3	Inkubation
15	Waschen der Mikrotiterplatte	4	Waschen der Mikrotiterplatte
16	Auftragen des Substrates in alle für den Test verwendeten Vertiefungen der Mikrotiterplatte		Auftragen des Substrates in alle für den Test verwendeten Vertiefungen der Mikrotiterplatte
17	Zugabe der Stopplösung	5	Zugabe der Stopplösung
18	Testauswertung	6	Testauswertung

Die Erfindung kann hiebei ihre Anwendung zur Detektion von Antigenen mit Hilfe eines Paares von Antikörper (Sandwich ELISA) finden. Ebenso ist der Nachweis von Antikörpern mit dem entsprechenden Antigen möglich. Die Detektion von Rezeptoren bzw. Liganden durch den jeweiligen Bindungspartner ist eine weitere Möglichkeit der Anwendung der vorliegenden Erfindung, sodaß eine große Anzahl von Testformaten zur Verfügung steht. Insbesondere kann der Test zum Nachweis von Proteinen, Steroiden, chemischen Verbindungen, Medikamenten, Nukleinsäuren, und ähnlichen Substanzen eingesetzt werden.

Die Detektion des Reaktionskomplexes kann mit Hilfe eines direkt gekoppelten Enzymes erfolgen (zum Beispiel Horse Radish Peroxidase, Alkalische Phosphatase u.ä.), über eine enzymatische Reaktion, welche durch einen Sekundärschritt erfolgt (Biotin-Streptavidin-HRP, enzym-gekoppelter Antikörper gegen den Detektionsantikörper u.ä.). Jedes weitere Label, welches für die Durchführung eines Immuntestes geeignet ist, wie Fluorochrome, Chemiluminenszenz Labels, radioaktive Labels, u.ä., kann ebenso benutzt werden.

Der Träger zur Immobilisierung des primären Bindungspartners ist vorzugsweise eine Polystyrol 96 Well Mikrotiterplatte, wobei jedoch jeder andere Träger, der für die Durchführung eines Immuntestes geeignet ist, ebenso für die vorliegende Erfindung eingesetzt werden kann.

Die zur Messung eingesetzten Proben können alle flüssigen Proben, die den Analyten enthalten, im speziellen Körperflüssigkeiten wie Seren, Plasmapräparationen, lokale Körper-

flüssigkeiten, Vollblut, u.ä. sowie Zellkulturüberstände, gepufferte Lösungen der Analyten u.ä., sein.

Die Erfindung wird nachfolgend anhand von spezifischen Anwendungsbeispielen näher erläutert.

Anwendungsbeispiel 1

Sandwich ELISA zum Nachweis von humanem ICAM-1

- A) Herstellung der Platten in Verbindung mit Proben verdünnungsmedium, Standardreihe, HRP-Konjugat

Schritt 1:

Beschichtung:

Die 96 well Mikrotiterplatten werden nach dem Stand der Technik mit 2,5µg/ml anti-ICAM-1 in PBS Puffer beschichtet (100µl pro well, über Nacht Inkubation bei 4°C).

Schritt 2:

Blockierung:

Die Beschichtungslösung wird abgesaugt, die Platte wird einmal mit Waschpuffer gewaschen (PBS/Tween). Zur Absättigung der Polystyroloberfläche (Verhinderung unspezifischer Bindungen) wird die Platte mit 300µl pro well PBS/2% BSA blockiert (2h, RT).

Schritt 3:

Fixierung:

Die Blockierungslösung wird abgesaugt, die Platte zweimal gewaschen, pro Well werden 150µl PBS/15% Sucrose hinzugefügt. Nach einer Stunde Inkubation bei RT wird die Fixierungslösung dekantiert. Die Platte wird ca. 20 Stunden bei 28°C im Umluft-trockenschrank getrocknet. Die Platte wird auf -20°C eingefroren.

Schritt 4:

Einbringung des Probenverdünnungsmediums:

Die beschichtete Platte wird im gefrorenen Zustand eingesetzt. Das Probenverdünnungsmedium wird auf 2°C gekühlt. Zur Erstellung der Standardreihe wird in den ersten beiden Reihen der Mikrotiterplatte in jede Vertiefung 100µl Probenverdünnungsmedium

vorgelegt. Für die Bestimmung des Blanks wird in die entsprechenden Vertiefungen 100µl Probenverdünnungsmedium vorgelegt. Zur Bestimmung der unbekannten Proben wird in jede entsprechende Vertiefung 90µl Probenverdünnungsmedium vorgelegt.

~~Schritt 5:~~

Erstellung der Standardreihe:

Die Arbeitslösung (20ng/ml) des Referenzmaterials (rekombinantes humanes ICAM-1) (2°C) wird in Doppelbestimmung in die beiden obersten Vertiefungen auf der linken Seite der Mikrotiterplatte eingebracht (100µl/well). Durch serielle 1:2 Verdünnung in der Platte wird eine Standardreihe hergestellt (10ng/ml; 5ng/ml; 2,5ng/ml; 1,25ng/ml; 0,63ng/ml).

Schritt 6:

Einbringung des HRP-Konjugates:

Die Arbeitslösung des HRP-Konjugates (anti-ICAM-1-HRP) wird auf 2°C gekühlt und rasch in alle Vertiefungen der Mikrotiterplatte eingebracht (50µl/well).

Schritt 7:

Lyophilisierung:

Die Mikrotiterplatte wird unmittelbar nach Beschickung mit allen Komponenten mit einer Folie abgedeckt und in die auf -30°C vorgekühlte Gefriertrocknungsanlage eingebracht. Die Lyophilisierung erfolgt ca. 20 Stunden bei -30°C. Die getrocknete Platte wird unmittelbar nach der Entnahme aus der Gefriertrocknungsanlage zusammen mit Trocknungsmittel in eine Aluminiumtasche eingeschweißt.

B) Testdurchführung:

Die Platte wird aus der Aluminiumtasche genommen.

Die Standardreihe sowie die Blanks werden durch Zugabe von 150µl destilliertem Wasser pro Vertiefung rehydriert, die Probenvertiefungen durch Zugabe von 140µl H₂O. In die Probenvertiefungen werden je 10µl der unbekannten Probe aufgetragen. Die Platte wird mit einer Folie abgedeckt und 1 Stunde bei RT inkubiert. Die Platte wird 3mal gewaschen, in jede Vertiefung der Platte wird 100µl Substratlösung zugegeben. Die Enzymreaktion wird nach

15 Minuten durch die Zugabe der Stopplösung (100µl) abgebrochen und die Farbintensität in den einzelnen Vertiefungen photometrisch ausgewertet.

Anwendungsbeispiel 2.

Sandwich ELISA zum Nachweis von humanem Interleukin 10 (IL-10)

- A) Herstellung der Platten in Verbindung mit Probenverdünnungsmedium, Standardreihe, Biotin-Konjugat, Streptavidin-HRP

Schritt 1:

Beschichtung:

Die 96 well Mikrotiterplatten werden nach dem Stand der Technik mit 5µg/ml anti-IL-10 in PBS Puffer beschichtet (100µl pro well, über Nacht Inkubation bei 4°C).

Schritt 2:

Blockierung:

Die Beschichtungslösung wird abgesaugt, die Platte wird einmal mit Waschpuffer gewaschen (PBS/Tween). Zur Absättigung der Polystyroloberfläche (Verhinderung unspezifischer Bindungen) wird die Platte mit 300µl pro well PBS/2% BSA blockiert (2h, RT).

Schritt 3:

Fixierung:

Die Blockierungslösung wird abgesaugt, die Platte zweimal gewaschen, pro Well werden 150µl PBS/15% Sucrose hinzugefügt. Nach einer Stunde Inkubation bei RT wird die Fixierungslösung dekantiert. Die Platte wird ca. 20 Stunden bei 28°C im Umluft-trockenschrank getrocknet. Die Platte wird auf -20°C eingefroren.

Schritt 4:

Einbringung des Probenverdünnungsmediums:

Die beschichtete Platte wird im gefrorenen Zustand eingesetzt. Das Probenverdünnungsmedium wird auf 2°C gekühlt. Zur Erstellung der Standardreihe wird in den ersten beiden Reihen der Mikrotiterplatte in jede Vertiefung 100µl Probenverdünnungs-

medium vorgelegt. Für die Bestimmung des Blanks wird in die entsprechenden Vertiefungen 100µl Probenverdünnungsmedium vorgelegt. Zur Bestimmung der unbekannten Proben wird in jede Vertiefung 50µl Probenverdünnungsmedium vorgelegt.

-Schritt 5:

Erstellung der Standardreihe:

Die Arbeitslösung (400pg/ml) des Referenzmaterials (rekombinantes humanes IL-10) (2°C) wird in Doppelbestimmung in die beiden obersten Vertiefungen auf der linken Seite der Mikrotiterplatte eingebracht (100µl/well). Durch serielle 1:2 Verdünnung in der Platte wird eine Standardreihe hergestellt (200 - 3.1 pg/ml).

Schritt 6:

Einbringung des Biotin-Konjugates und Streptavidin-HRP:

Die Arbeitslösung des Gemisches aus Biotin-Konjugat (anti-IL-10-BT) und Streptavidin-HRP wird auf 2°C gekühlt und rasch in alle Vertiefungen der Mikrotiterplatte eingebracht (50µl/well).

Schritt 7:

Lyophilisierung:

Die Mikrotiterplatte wird unmittelbar nach Beschickung mit allen Komponenten mit einer Folie abgedeckt und in die auf -30°C vorgekühlte Gefriertrocknungsanlage eingebracht. Die Lyophilisierung erfolgt ca. 20 Stunden bei -30°C. Die getrocknete Platte wird unmittelbar nach der Entnahme aus der Gefriertrocknungsanlage zusammen mit Trocknungsmittel in eine Aluminiumtasche eingeschweißt.

B) Testdurchführung:

Die Platte wird aus der Aluminiumtasche genommen.

Die Standardreihe sowie die Blanks werden durch Zugabe von 150µl destilliertem Wasser pro Vertiefung rehydriert, die Probenvertiefungen durch Zugabe von 100µl H₂O. In die Probenvertiefungen werden je 50µl der unbekannten Probe aufgetragen. Die Platte wird mit einer Folie abgedeckt und 3 Stunden bei RT inkubiert. Die Platte wird 3mal gewaschen, in jede Vertiefung der Platte wird 100µl Substratlösung zugegeben. Die Enzymreaktion wird nach 15 Minuten durch die Zugabe der Stopplösung

(100µl) abgebrochen und die Farbintensität in den einzelnen Vertiefungen photometrisch ausgewertet.

Anwendungsbeispiel 3

~~Inverser Sandwich-ELISA zum Nachweis von humanem~~
Antikörpern gegen Interferon alpha (IFNα)

- A) Herstellung der Platten in Verbindung mit Probenverdünnungsmedium, Standardreihe, HRP-Konjugat

Schritt 1:

Beschichtung: Die 96 well Mikrotiterplatten werden nach dem Stand der Technik mit 10µg/ml Streptavidin in PBS Puffer beschichtet (100µl pro well, über Nacht Inkubation bei 4°C).

Schritt 2:

Spezifische Beschichtung/Blockierung: Die Streptavidin-Beschichtungslösung wird abgesaugt, die Platte wird einmal mit Waschpuffer gewaschen (PBS/Tween). Zur spezifischen Beschichtung der Platte sowie zur Absättigung der Polystyroloberfläche (Verhinderung unspezifischer Bindungen) wird die Platte mit 300µl pro well IFNα-Biotin Konjugat, 1µg/ml in PBS/2% BSA beschichtet beziehungsweise blockiert (2h, 37°C).

Schritt 3:

Fixierung: Die Beschichtungs/Blockierungslösung wird abgesaugt, die Platte zweimal gewaschen, pro Well werden 150µl PBS/15% Sucrose hinzugefügt. Nach einer Stunde Inkubation bei RT wird die Fixierungslösung dekantiert. Die Platte wird ca. 20 Stunden bei 28°C im Umlufttrockenschrank getrocknet. Die Platte wird auf -20°C eingefroren.

Schritt 4:

Einbringung des Probenverdünnungsmediums:

Die beschichtete Platte wird im gefrorenen Zustand eingesetzt. Das Probenverdünnungsmedium wird auf 2°C gekühlt. Zur Erstellung der Standardreihe wird in den ersten beiden Reihen der Mikrotiterplatte in jede Vertiefung 100µl Probenverdünnungsmedium vorgelegt. Für die Bestimmung des Blanks wird in die entsprechenden Vertiefungen 100µl Probenverdünnungsmedium vor-

gelegt. Zur Bestimmung der unbekannten Proben wird in jede Vertiefung 75µl Probenverdünnungsmedium vorgelegt.

Schritt 5:

Erstellung der Standardreihe:

Die Arbeitslösung (200ng/ml) des Referenzmaterials (anti-human-IFN α Antikörper) (2°C) wird in Doppelbestimmung in die beiden obersten Vertiefungen auf der linken Seite der Mikrotiterplatte eingebracht (100µl/well). Durch serielle 1:2 Verdünnung in der Platte wird eine Standardreihe hergestellt (100 - 1,6ng/ml).

Schritt 6:

Einbringung des HRP-Konjugates:

Die Arbeitslösung des HRP-gekoppelten IFN α Proteins wird auf 2°C gekühlt und rasch in alle Vertiefungen der Mikrotiterplatte eingebracht (50µl/well).

Schritt 7:

Lyophilisierung:

Die Mikrotiterplatte wird unmittelbar nach Beschickung mit allen Komponenten mit einer Folie abgedeckt und in die auf -30°C vorgekühlte Gefriertrocknungsanlage eingebracht. Die Lyophilisierung erfolgt ca. 20 Stunden bei -30°C. Die getrocknete Platte wird unmittelbar nach der Entnahme aus der Gefriertrocknungsanlage zusammen mit Trocknungsmittel in eine Aluminiumtasche eingeschweißt.

B) Testdurchführung:

Die Platte wird aus der Aluminiumtasche genommen.

Die Standardreihe sowie die Blanks werden durch Zugabe von 150µl destilliertem Wasser pro Vertiefung rehydriert, die Probenvertiefungen durch Zugabe von 125µl H₂O. In die Probenvertiefungen werden je 25µl der unbekannten Probe aufgetragen. Die Platte wird mit einer Folie abgedeckt und 2 Stunden bei RT inkubiert. Die Platte wird 3mal gewaschen, in jede Vertiefung der Platte wird 100µl Substratlösung zugegeben. Die Enzymreaktion wird nach 15 Minuten durch die Zugabe der Stopplösung (100µl) abgebrochen und die Farbtintensität in den einzelnen Vertiefungen photometrisch ausgewertet.

Anwendungsbeispiel 4**BioLISA zum Nachweis von humanem Tumor Necrosis Factor alpha (TNF α) (Rezeptor-Liganden Bindung)**

- A) Herstellung der Platten in Verbindung mit Probenverdünnungsmedium, Standardreihe, Biotin-Konjugat, Streptavidin-HRP

*Schritt 1:***Beschichtung:**

Die 96 well Mikrotiterplatten werden nach dem Stand der Technik mit 1 μ g/ml rekombinantem TNF-Rezeptor in PBS Puffer beschichtet (100 μ l pro well, über Nacht Inkubation bei 4°C).

*Schritt 2:***Blockierung:**

Die Beschichtungslösung wird abgesaugt, die Platte wird einmal mit Waschpuffer gewaschen (PBS/Tween). Zur Absättigung der Polystyroloberfläche (Verhinderung unspezifischer Bindungen) wird die Platte mit 300 μ l pro well PBS/2% BSA blockiert (2h, RT).

*Schritt 3:***Fixierung:**

Die Blockierungslösung wird abgesaugt, die Platte zweimal gewaschen, pro Well werden 150 μ l PBS/15% Sucrose hinzugefügt. Nach einer Stunde Inkubation bei RT wird die Fixierungslösung dekantiert. Die Platte wird ca. 20 Stunden bei 28°C im Umluft-trockenschrank getrocknet. Die Platte wird auf -20°C eingefroren.

*Schritt 4:***Einbringung des Probenverdünnungsmediums:**

Die beschichtete Platte wird im gefrorenen Zustand eingesetzt. Das Probenverdünnungsmedium wird auf 2°C gekühlt. Zur Erstellung der Standardreihe wird in den ersten beiden Reihen der Mikrotiterplatte in jede Vertiefung 100 μ l Probenverdünnungsmedium vorgelegt. Für die Bestimmung des Blanks wird in die entsprechenden Vertiefungen 100 μ l Probenverdünnungsmedium vorgelegt. Zur Bestimmung der unbekannten Proben wird in jede Vertiefung 50 μ l Probenverdünnungsmedium vorgelegt.

Schritt 5:

Erstellung der Standardreihe:

Die Arbeitslösung (2000pg/ml) des Referenzmaterials (rekombinantes humanes TNF α) (2°C) wird in Doppelbestimmung in die beiden obersten Vertiefungen auf der linken Seite der Mikrotiterplatte eingebracht (100 μ l/well). Durch serielle 1:2 Verdünnung in der Platte wird eine Standardreihe hergestellt (1000 - 16 pg/ml)

Schritt 6:

Einbringung des Biotin-Konjugates und Streptavidin-HRP:

Die Arbeitslösung des Gemisches aus Biotin-Konjugates (anti-TNF α -BT) und Streptavidin-HRP wird auf 2°C gekühlt und rasch in alle Vertiefungen der Mikrotiterplatte eingebracht (50 μ l/well).

Schritt 7:

Lyophilisierung:

Die Mikrotiterplatte wird unmittelbar nach Beschickung mit allen Komponenten mit einer Folie abgedeckt und in die auf -30°C vorgekühlte Gefriertrocknungsanlage eingebracht. Die Lyophilisierung erfolgt ca. 20 Stunden bei -30°C. Die getrocknete Platte wird unmittelbar nach der Entnahme aus der Gefriertrocknungsanlage zusammen mit Trocknungsmittel in Aluminiumtaschen eingeschweißt.

B) Testdurchführung:

Die Platte wird aus der Aluminiumtasche genommen.

Die Standardreihe sowie die Blanks werden durch Zugabe von 150 μ l destilliertem Wasser pro Vertiefung rehydriert, die Probenvertiefungen durch Zugabe von 100 μ l H₂O. In die Probenvertiefungen werden je 50 μ l der unbekannten Probe aufgetragen. Die Platte wird mit einer Folie abgedeckt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Platte wird 3mal gewaschen, in jede Vertiefung der Platte wird 100 μ l Substratlösung zugegeben. Die Enzymreaktion wird nach 15 Minuten durch die Zugabe der Stopplösung (100 μ l) abgebrochen und die Farbintensität in den einzelnen Vertiefungen photometrisch ausgewertet.

Ansprüche:

1. Immun-Test-Kit für die qualitative und quantitative Bestimmung einer Probe durch spezifische Bindungspartner wie ~~z.B. Antikörper, Antigene, Rezeptoren und Liganden, mit einer~~ Träger- bzw. einer Mikrotiterplatte mit einer Mehrzahl von Vertiefungen, wobei der Träger bzw. die Mikrotiterplatte mit einem primären Bindungspartner vorbeschichtet ist und der Bindungspartner fixiert als Lyophilisat vorliegt, dadurch gekennzeichnet, daß in einem Teil der Vertiefungen der Mikrotiterplatte zusätzlich eine Referenzstandardreihe der zu bestimmenden Probe mit inkrementeller Verdünnung in lyophilisierter Form vorliegt.
2. Immun-Test-Kit nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Vertiefungen der Mikrotiterplatte zusätzlich ein Enzym- oder Biotin-gekoppeltes Konjugat eines Sekundärbindungspartners, insbesondere -antikörpers, und im Fall des Biotin-gekoppelten Konjugates ein Enzym in lyophilisierter Form enthalten.
3. Immun-Test-Kit nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Vertiefungen der Mikrotiterplatte ein Probenverdünnungsmedium in lyophilisierter Form enthalten.
4. Immun-Test-Kit nach Anspruch 1, 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, daß der Test-Kit zusätzlich zur vorbeschichteten Mikrotiterplatte lediglich Waschpuffer, Substratlösung und Stopplösung enthält.
5. Immun-Test-Kit nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß im Falle von Biotin-gekoppeltem Sekundärantikörper-Konjugat als Sekundärreagenz Streptavidin - Horse Radish Peroxidase (HRP) eingesetzt ist.
6. Immun-Test-Kit nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass der Test-Kit Stabilisatoren für Peroxidase beziehungsweise generelle Lyoprotektanten wie Proteine

(z.B. Albumin (z.B. BSA) Protein Hydrolysate (Peptone, Gelatine...) Casein) und/oder Polymere (z.B. Dextran, PVA, PVP), Zucker (z.B. Saccharose, Trehalose, Lactose, Xylit, Sorbit, Mannit, Maltose, Glucose, Inosit) und/oder Bakteriostatische Mittel (z.B. Thimerosal, Proclin) und/oder phenolische Substanzen und Aniline auch mit Substituenten (kleine Alkyl-Reste oder Cl, Br...) (z. B. o-Methoxyphenol, o-Methylphenol, p-Methylphenol, o-Aminophenol, o-Hydroxybenzoesäure, (o, m oder p)-Hydroxybenzylalkohol, Anilin, p-Aminobenzoessäure, p-Methoxyanilin, Benzylalkohol, Benzoessäure, p-Nitrophenol, Benzylamin, 1-Phenyl-1,2-ethandiol, trans-1,2-Cyclohexandiol, cis-1,2-Cyclohexandicarbonsäure, Cyclohexylamin) und/oder Hydrophobe Verbindungen und/oder Lösungsmittel (z.B. DMF, Ethylenglykol, DMSO) und/oder Detergenzien (z.B. Tween-20) und/oder Aryl-Borsäureverbindungen (z.B. Phenylborsäure, 4-Brom-Phenylborsäure, 3-Acetamidophenylborsäure, 1-Naphtylborsäure) und/oder Substratanaloge (z.B. TMB, Luminol) und/oder Poly-Hydroxy-Verbindungen (z.B. Polyole, Polyethylenglykol, Glycerin) und/oder Ectoine (z.B. (S)-2-methyl-1,4,5,6-tetrahydropyrimidine-4-carboxylic-acid [THP(B)], (S,S)- β -2-methyl-5-hydroxy-1,2,4,5,6-tetrahydropyrimidine-4-carboxylicacid, [THP(A)]) und/oder Ionen bzw. polyvalente Ionen (z. B. Metallionen (Al, Zn, Mg, Fe, Cu,...)) und/oder Komplexbildner (z.B. EDTA) und/oder Aminosäuren (z.B. Glyzin, Prolin, 4-Hydroxyprolin, Serin, Glutamat, Alanin, Lysin, Sarcosin, γ -Aminobutyric acid, Phenylalanin) und/oder Substanzen wie TRIS, Salze, Amine, Na-Cholate, Saccharose monolaurat und/oder 2-O- β -Mannosylglyzerat enthält.

7. Verwendung eines Immun-Test-Kits nach einem Ansprüche 1 bis 6, für den Einsatz in der Forschungsdiagnostik und in-vitro Diagnostik, für den Einsatz in der Erregerserologie, wie zum Beispiel zum Nachweis von Infektionen durch HIV, HepV, EBV, CMV usw., für den Einsatz in der Tumordiagnostik, wie zum Beispiel zum Nachweis von Tumormarkern oder Tumor assoziierten Proteinen, Vaskularisierungsmarkern, Metastasierungsmarkern usw., für den Einsatz in der Allergologie wie zum Beispiel zum Nachweis von Tierallergenen, Pflanzenpollen, Nahrungsbestandteilen usw., für

den Einsatz in der Autoimmun-Diagnostik wie zum Beispiel zum Nachweis der Auto-Antigene im Bereich ANA/ENA, Diabetes mellitus/ IDDM, Schilddrüsen Antigene, Autoimmun Hepatitis, APS, usw., für den Nachweis von immunologischen Störungen durch ~~entzündliche Prozesse oder Infektionen wie zum Beispiel zum~~ Nachweis von Zytokinen, Adhäsionsmolekülen, Chemokinen, usw., für den Nachweis von Änderungen des Hormonhaushaltes wie zum Beispiel Ovulationstests, Schwangerschaftstests, usw., für den Einsatz zum Therapie-Monitoring wie zum Beispiel zum Nachweis von therapeutischen Antikörpern und Antigenen, organischen und anorganischen Verbindungen, für den Nachweis von Zelltod durch Apoptose oder Nekrose und/oder für den Nachweis von genetischen Veränderungen, genetischen Erkrankungen.

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.